

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 791 263

②① N° d'enregistrement national : **99 03791**

⑤① Int Cl⁷ : A 61 K 38/00, A 61 K 31/47

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 26.03.99.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : MALINA HALINA ZOFIA — FR.

⑦② Inventeur(s) : MALINA HALINA ZOFIA.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 29.09.00 Bulletin 00/39.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : MALINA HALINA.

⑤④ PRÉPARATIONS DES MÉDICAMENTS BASES SUR UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE
L'ACCUMULATION DE PROTÉINES MODIFIÉES PAR L'ACIDE XANTHURÉNIQUE.

⑤⑦ L'invention a pour but l'utilisation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique pour induire une réponse immunitaire. Une réponse immunitaire contre ces composés a pour but une prévention des maladies déclenchées par l'accumulation de protéines mal repliées auxquelles peuvent appartenir des maladies associées au vieillissement comme par exemple la maladie d'Alzheimer, les maladies à prions, la cataracte sénile, l'athérosclérose, les rhumatismes, la dégénération de la rétine avec l'âge.

FR 2 791 263 - A1



Préparations des médicaments basés sur une réponse immunitaire contre l'accumulation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique

La présente invention a pour but l'induction d'une réponse immunitaire contre les pathologies induites par des modifications de physiologie cellulaire par l'acide xanthurénique. La présente invention concerne aussi une façon d'induction régulée de pathologie cellulaire en présence de l'acide xanthurénique. Elle est relative à une formation de protéines modifiées de façon covalente par l'acide xanthurénique *in vitro* ou dans un système cellulaire.

La base de l'invention est une observation du fait que l'acide xanthurénique mène à la modification covalente de protéines dans des cellules et provoque une modification de la physiologie cellulaire. Précédemment, il a été reporté que l'acide xanthurénique s'accumule dans le cristallin de l'œil bovin (Malina et al. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1995, 233, 38-44), et humain (Malina et al. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1996, 234, 723-730) avec l'âge, dans sa présence les α , β , γ - cristallines formes des agrégats (idem) et deviennent fluorescentes (Malina et al. Eur. J. Ophthalmol. 1996, 6, 250-256). Les conjugués covalents sont formés par la préparation des produits oxydés de l'acide xanthurénique, nommés DOXA et sa réaction avec des cristallines de l'œil (Malina et al. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1996, 234, 723-730).

Récemment, les expériences ont montré que l'acide xanthurénique s'accumulant dans une cellule conduit à une modification de la physiologie cellulaire. Cette modification est due à une accumulation de protéines mal repliées. L'acide xanthurénique peut former des liaisons covalentes avec des protéines. En présence de l'acide xanthurénique qui a une couleur jaune, des protéines deviennent jaunes à cause de celui-ci. Cette couleur persiste après l'électrophorèse des protéines sur le gel dénaturant. Ces résultats montrent que l'acide xanthurénique est lié avec les protéines de façon covalente. Pour changer la conformation d'une protéine, il est suffisant de modifier un acide aminé; de nombreux exemples sont présents dans la littérature scientifique. En présence de l'acide xanthurénique comme l'indiquent les exemples donnés dans cette description, un à plusieurs acides aminés peuvent être modifiés. Pour cette raison, la présence de l'acide xanthurénique dans une cellule provoque une surexpression des protéines chaperonnes nommées "glucose regulated proteins 94" GRP94.

La surexpression de ces protéines est connue comme étant provoquée par l'accumulation des protéines mal repliées (Kozutsumi Nature 1998, 332, 462-464).

- L'acide xanthurénique modifie des protéines de façon aléatoire et cette modification concerne aussi les protéines chaperonnes comme par exemple la GRP 94 et la calréticuline. Etant donné que ces protéines sont responsables de la conformation correcte des protéines, leur modification accélère l'accumulation des protéines mal
- 5 repliées et aussi parmi elles des immunoglobulines mal repliées. Ces modifications complexes des protéines par l'acide xanthurénique, permet de laisser fonctionner des cellules avec une physiologie modifiée. L'accumulation des protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans différents types de cellules (par exemple les cellules des astrocytes, les cellules épithéliales du cristallin) provoque par exemple une surexpression
- 10 des proteases, une dégradation du calréticuline, une modification du facteur nucléaire-kappaB, et une induction du β -amyloïde (A4).
- Ces résultats montrent que la formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique mène à une pathologie cellulaire en induisant le changement de nombreuses protéines. Les changements observés sont en fonction du degré de la modification de protéines par
- 15 l'acide xanthurénique. Ces résultats montrent qu'il est possible d'induire une pathologie cellulaire de façon artificielle en augmentant dans les cellules le niveau de protéines modifiées par l'acide xanthurénique. Ce nouveau mécanisme est provoqué par la modification des protéines par l'acide xanthurénique dans une cellule. Dans une culture cellulaire des astrocytes une augmentation de niveau de protéines modifié par l'acide
- 20 xanthurénique provoque l'induction de β -amyloïde (A4), qui est reconnu par anticorps monoclonale de Dako, Danemark, utilisé pour la diagnostique de la maladie de Alzheimer. La raison de cette induction de β -amyloïde est une modification de la conformation de la protéine précurseur de l'amyloïde (PPA), due à la modification par l'acide xanthurénique. Cette modification donne le signal à une induction de proteases, qui dégradent le PPA
- 25 modifiée et induites la formation de β -amyloïde (A4).
- L'acide xanthurénique est un acide aminé de la voie de dégradation du tryptophane et son accumulation dans différents types de cellules peut conduire à diverses pathologies. On peut prévoir que l'animal dans lequel on augmente le niveau de protéines modifiées par l'acide xanthurénique peut servir comme modèle pour étudier l'effet de médicaments.
- 30 Une introduction directe d'acide xanthurénique par voie orale ou d'autres voies, peut servir comme un modèle de développement de la maladie d'Alzheimer, les maladies à priones, la cataracte sénile, l'athérosclérose, les rhumatismes, la dégénéral de la rétine avec l'âge.

L'observation du fait que l'acide xanthurénique provoque une dérégulation de la physiologie cellulaire permet une induction régulée de la pathologie cellulaire.

Des protéines modifiées par l'acide xanthurénique et injectées à un animal vont induire une réponse immunitaire contre les protéines mal repliées. A cause de la modification du

5 système immunitaire par l'acide xanthurénique et à la suite d'une dégradation des protéines chaperonnes comme la GRP94, les cellules pathologiques ne sont pas éliminées.

L'induction de la réponse immunitaire contre les protéines mal repliées peut prévenir l'effet pathologique qui a lieu à la formation de ces protéines au cours de vieillissement.

Les vaccins basés sur des protéines modifiées par l'acide xanthurénique vont avoir un rôle

10 préventif contre les maladies induites par des protéines ainsi modifiées. Les protéines modifiées par l'acide xanthurénique peuvent être administrer aux mammifères en utilisant tous les solvants non toxique dans lesquelles sont solubles. Des degrés des modifications de protéine par l'acide xanthurénique, et quantité de protéine à administrer va dépendre de protéine à modifier et de but recherché par vaccination. Les fragments de

15 protéines, des peptides ou des séquences synthétiques peuvent être utilisés pour former des produits conjugués avec l'acide xanthurénique. Ces composés sont introduits dans un mammifère pour induire une réponse immunitaire.

Exemple 1.

Formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans la culture de cellules

20 épithéliales.

La culture primaire des cellules épithéliales bovins de dans un milieu du type milieu essentiel minimal (MEM) a été traitée par l'acide xanthurénique. L'acide xanthurénique a été ajouté dans ce milieu à concentration 0, 1, 2, 4 mM. Après 24 heures des cultures les cellules ont été lavées en utilisant un tampon PBS (5 mM sodium phosphate, 150 mM

25 NaCl, pH 7.1) et lysé dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl (pH8), 150 mM NaCl 100µg/ml PMSF, 1% Triton X-100. Des extraits ont été appliqués sur une colonne des

Sephadex G-50 et élués en utilisant 0,005 M NaHCO₃. L'acide xanthurénique a été quantifié dans les extraits de protéines par la spectrométrie UV. La concentration de protéines a été calculée en utilisant une gamme étalonnée des mesures de l'absorption des

30 quantités connues de l'albumines du bovin ayant le poids moléculaire de 67,5 kD après une incubation avec l'acide xanthurénique $\lambda=342$ nm ($E_{\lambda_{max}}$ 6 500 selon Merck Index, Merck and Co., édition White House Station, New York, 1996). La concentration de

l'acide xanthurénique a correspondu respectivement au 0, 1, 3, 9 moles par mole de protéines. L'analyse des protéines après un transfert de gel SDS-PAGE sur une membrane de nylon (Western blot) en présence des différents anticorps ont montré qu'en présence de protéines modifiées par l'acide xanthurénique les niveaux de facteur nucléaire- κ B, β -amyloïde (A4), et calpain Lp82 ont été changés.

Exemple 2

Formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans la culture cellulaire des astrocytes.

La culture d'astrocytes de rat dans le milieu MEM a été traitée par l'acide xanthurénique à concentration 0, 2, 4, 8 mM. La concentration de l'acide xanthurénique (XA) dans des extraits a été calculée comme dans l'exemple 1, et a correspondu respectivement au 0 ; 1 mole XA par 8 moles de protéines ; 3 moles de XA par 2 moles de protéines ; 1 mole XA par moles de protéines par mole de 5 protéines.

En présence de protéines modifiées par d'acide xanthurénique, le facteur nucléaire κ B ont eu de poids moléculaire de 50 kD, 52kD, et 55 kD au lieu de la taille normale 50 kD.

La formation β -amyloïde (A4), qui n'était pas détectable sans la présence de l'acide xanthurénique, a été fortement induite. Ces résultats ont montré qu'une augmentation de l'acide xanthurénique dans la cellule va provoquer une dérégulation de la physiologie cellulaire. Ces résultats montrent qu'il est possible d'induire artificiellement une pathologie cellulaire en augmentant dans une cellule le niveau des protéines modifiées par l'acide xanthurénique. Le nouveau mécanisme décrit est provoqué par la modification covalente des protéines par l'acide xanthurénique.

Exemple 3. Formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans un extrait cellulaire de la rétine.

L'acide xanthurénique à 0, 2, 4, 8 mM a été incubé avec des extraits de protéines de la rétine pendant une semaine et les extraits ont été traités comme décrit dans l'exemple 1, et les concentrations ont correspondu respectivement au 0; 2 mole XA par 1 mole de protéines; 3 moles de XA par 1 mole de protéines; 5 moles XA par moles de protéines.

Exemple 4.

Formation de protéines modifiées par l'acide xanthurénique dans la culture de tissus.

Les cristallins de porc ont été incubés dans les solutions d'acide xanthurénique 0 et 2 mM pendant une semaine. L'acide xanthurénique a été diffusé dans le cristallin. Le cortex du cristallin a été homogénéisé dans un tampon phosphate de pH 7.4. La partie non soluble de protéines a été séparée par centrifugation à 10 000g. La concentration des protéines a été mesurée à 280 nm, les parties insolubles des protéines ont été dissoutes dans 4 mM urée ou dans 8 mM d'urée. L'acide xanthurénique était présent dans tous les extraits et sa quantité a augmenté avec l'insolubilité des protéines : les concentrations en acide xanthurénique dans les protéines correspondaient à 1 mole XA pour 1 mole de protéines dans la partie soluble du tampon phosphate, 2 moles de XA dans les protéines solubles dans 4mM d'urée, et 3 moles de XA dans les protéines solubles dans 8 mM d'urée.

Exemple 5. Préparation des conjugués de l'acide xanthurénique avec des protéines de bactéries.

Le mycelium de *Streptomyces incarnatus*, une bactérie mycelial Gram-positive, a été cultivée en l'absence ou en présence de 2 mM d'acide xanthurénique. 100 ml de chaque culture a été suspendue dans le tampon de phosphate à concentration 0.05 M, de pH 7, contenant 0.1% de β -mercaptoéthanol. La suspension a été congelée dans un bain-marie contenant de la glace carbonique-metanol. Les cellules congelées ont été casées dans la presse de Hinton avec une pression de 360 atmosphères. Les protéines de cytosol ont été séparées de la fraction des membranes par centrifugation de 100 000g pendant une heure. La solution a été traitée par l'addition de 2,5 % de streptomycine pour précipiter l'acide nucléique, qui ont été éliminé par centrifugation à 5000g pendant 10 min. Les concentrations d'acide xanthurénique dans les protéines ont été mesurées comme décrit dans l'exemple 1. Les concentrations en acide xanthurénique dans les protéines correspondaient à 0 et 0.5 mole d'acide xanthurénique pour une mole de protéines.

Exemple 6. Induction une réponse immunitaire contre la protéine modifiée par l'acide xanthurénique.

La calréticuline est modifiée par l'acide xanthurénique dans une cellule et partiellement dégradé. 3 mg de calréticuline dans le tampon phosphate stérile de pH 7,4 ont été incubés avec 4 mM d'acide xanthurénique pendant 72 heures, à température ambiante.

La calréticuline modifiée a été administré au souris. Six souris (pesant 100 g environs) ont été immunisées par injection sous-cutané en utilisant les mêmes quantités 500 μ g de

calréticuline. Un autre groupe de souris est resté sans traitement. L'immunisation a été répétée trois fois par dans l'intervalle de deux semaines. La calréticuline a été analysée dans le plasma des animaux après trois mois. Des protéines de plasma de souris ont été analysées par électrophorèse sur un gel dénaturant (Laemmli , Nature 1970, 227, 680-685).

- 5 Des protéines ont été transférées sur une membrane. La détection de la calréticuline a été effectuée en utilisant un anticorps contre la calréticuline. Dans le plasma de souris non traités, la calréticuline dégradée présentait un poids moléculaire de 55 kD au lieu de 63kD. Chez les souris traitées le plasma a contenu de 60 pour-cent moins de la calréticuline dégradées.
- 10 Cette voie peut être utilisée pour retarder le vieillissement pathologique des cellules due à une modification de la conformation des protéines, parmi eux des chaperonne protéines. Les injections des protéines modifiées par l'acide xanthurénique peuvent avoir un effet préventif contre de pathologie liées au vieillissement. Une immunothérapie utilisant les anticorps monoclonaux serait possible pour retarder l'effet de protéines mal repliées. Par
- 15 exemple un anticorps contre la protéine précurseur d'amyloïde modifiée par l'acide xanthurénique est supposée retarder le développement de la maladie d'Alzheimer.

Revendications

- 4 1) Composé destiné à provoquer des réactions immunitaires par introduction dans un organisme vivant caractérisé en ce qu'il est le produit de la réaction de l'acide xanthurénique avec une protéine.
- 2) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'acide xanthurénique est lié
- 5 à une protéine, un peptide, ou une séquence de protéine.
- 3) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que cette protéine est une protéine humaine ou une protéine d'un autre mammifère.
- 4) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que cette protéine est une protéine bactérienne.
- 10 5) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la préparation est faite en ajoutant l'acide xanthurénique dans les milieux de culture de cellules de mammifères.
- 6) Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la préparation est faite en ajoutant l'acide xanthurénique dans les milieux de culture de tissus.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 572854
FR 9903791

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A,D	MALINA, HALINA ZOFIA ET AL: "Xanthurenic acid derivative formation in the lens is responsible for senile cataract in humans" GRAEFE'S ARCH. CLIN. EXP. OPHTHALMOL., vol. 234, no. 12, décembre 1996 (1996-12), pages 723-730, XP000867409 * page 725, colonne 2, ligne 35 - page 727, colonne 1, ligne 25 *	1-6
A	KOTAKE Y ET AL: "The physiological significance of the xanthurenic acid-insulin complexes." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 77, no. 3, mars 1975 (1975-03), pages 685-687, XP000867442 * page 686, colonne 2, ligne 3 - ligne 7 * * le document en entier *	1-6
A	MURAKAMI E: "Purification of xanthurenic acid-insuline complex." ACTA VITAMINOLOGICA ET ENZYMOLOGICA, vol. 29, no. 1-6, 1975, pages 240-242, XP000867444 * le document en entier *	5,6
A	KOBAYASHI K ET AL: "Influence of blood proteins on biomedical analysis. I. Interaction of xanthurenic acid with bovine serum albumin." CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, vol. 28, no. 10, octobre 1980 (1980-10), pages 2960-2966, XP002128451 * page 2964, dernier paragraphe * * le document en entier *	1-6
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
		C07K A61K C07D
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
21 janvier 2000		Teyssier, B
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		